

PN - JP5130899 A 19930528

PA - TOA MEDICAL ELECTRONICS CO LTD

I - C12Q1/56 ; G01N21/47 ; G01N21/59 ; G01N21/77 ; G01N33/86

TI - DETERMINATION OF BLOOD COAGULATION

AB - PURPOSE: To accurately determine the coagulability of a specimen plasma by mixing a polymeric substance to a specimen plasma, mixing a reagent containing a coagulation factor activating substance to the mixture to effect the coagulation reaction and measuring the variation in the optical property and viscosity of the mixture caused by the progress of the reaction with time.

- CONSTITUTION: A high molecular substance is mixed to a specimen plasma and the mixture is mixed with a reagent containing a coagulation factor activating substance to effect the coagulation reaction. The variation in the optical property of the viscosity of the mixture caused by the progress of the reaction is measured with time to determine the coagulability of the specimen plasma. The reagent is preferably those containing tissue thromboplastin, phospholipid or thrombin. The high molecular substance is e.g. dextran, polyethylene glycol, polyvinyl alcohol or polymeric polysaccharide.

AN - 1993-208302 [26]

AP - JP19910246742 19910830; [Previous Publ. JP5130899] ; JP19910246742 19910830

PR - JP19910246742 19910830

TI - Measurement of blood coagulation - by mixing high polymer with plasma sample then adding reagent contg. blood coagulation factor activating substance

IW - MEASURE BLOOD COAGULATE MIX HIGH POLYMER PLASMA SAMPLE ADD REAGENT CONTAIN BLOOD COAGULATE FACTOR ACTIVATE SUBSTANCE

PA - (TOAI-N) TOA IYO DENSHI KK

PN - JP3074611B2 B2 20000807 DW200042 C12Q1/56 006pp

- JP5130899 A 19930528 DW199326 C12Q1/56 007pp

IC - C12Q1/56 ; G01N21/47 ; G01N21/59 ; G01N21/77 ; G01N33/86

AB - J05130899 A reagent is mixed with a sample plasma to coagulate it and the optical property or the viscosity of the mixt. is measured with the passage of time to determine the coagulating ability with the passage of time to determine the coagulating ability of the sample plasma. The procedure comprises (i) mixing a high polymer with the sample plasma and (ii) mixing a reagent contg. a blood coagulation factor-activating substance with the obtd. mixt.

- The high polymer is pref. a high molecular vinyl such as PEG, PVA and polynoxilin or a high molecular polysaccharide such as dextran, glycogen, soluble starch, dextrin and agarose. The blood coagulation factor-activating substance is pref. tissue thromboplastin, a phospholipid or thrombin.

- USE/ADVANTAGE - The method can detect the exact coagulation period even when only a small amt. of fibrinogen is prese(Dwg.0/0)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-130899

(43) 公開日 平成5年(1993)5月28日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/56		6807-4B		
G 0 1 N 21/47	Z	7370-2J		
21/59	Z	7370-2J		
21/77	B	7235-2J		
33/86		7055-2J		

審査請求 未請求 請求項の数7(全7頁)

(21) 出願番号 特願平3-246742

(22) 出願日 平成3年(1991)8月30日

(71) 出願人 390014960

東亜医用電子株式会社
兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番1号

(72) 発明者 米村 勝

神戸市中央区港島中町7丁目2番1号 東
亜医用電子株式会社内

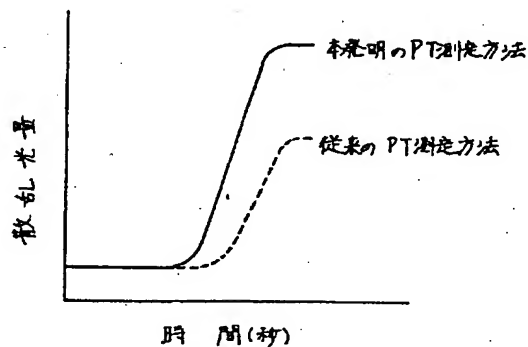
(74) 代理人 弁理士 塩出 真一

(54) 【発明の名称】 血液凝固測定方法

(57) 【要約】

【目的】 光学的測定装置などを使用して検体血漿の凝固活性を測定する方法において、従来より大きな光学的变化量が得られるようにする。

【構成】 検体血漿に、高分子物質を混合する第一過程と、混合液に凝固因子活性化物質を含有する試薬を混合する第二過程とを含む方法で、検体血漿の凝固能を正確に検出する。試薬としては、組織トロンボプラスチン含有試薬、リン脂質含有試薬、トロンビン含有試薬が用いられる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体血漿に試薬を混合して凝固反応を行なわせ、反応の進行に伴う混合液の光学的特性又は粘強度を経時的に追跡し、検体血漿の凝固能を測定する方法において、

検体血漿に、高分子物質を混合する第一過程と、第一過程における混合液に、凝固因子活性化物質を含有する試薬を混合する第二過程と、を包含することを特徴とする血液凝固測定方法。

【請求項2】 高分子物質として、高分子ビニル、高分子多糖の少なくとも一方を用いることを特徴とする請求項1記載の血液凝固測定方法。

【請求項3】 高分子物質として、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリノキシリンからなる群より選ばれた高分子ビニルを用いることを特徴とする請求項1記載の血液凝固測定方法。

【請求項4】 高分子物質として、デキストラン、グリコーゲン、可溶性デンプン、デキストリン、アガロースからなる群より選ばれた高分子多糖を用いることを特徴とする請求項1記載の血液凝固測定方法。

【請求項5】 第一過程が、検体血漿中に高分子物質を直接混合する過程であることを特徴とする請求項1記載の血液凝固測定方法。

【請求項6】 第一過程が、高分子物質を含有する液を検体血漿に混合する過程であることを特徴とする請求項1記載の血液凝固測定方法。

【請求項7】 凝固因子活性化物質を含有する試薬として、組織トロンボプラスチン含有試薬、リン脂質含有試薬、トロンビン含有試薬からなる群より選ばれた試薬を用いることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載の血液凝固測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、光学的測定装置、粘強度検出装置などを使用して検体血漿の凝固活性を測定するための血液凝固測定方法、詳しくは、従来より大きな光学的変化量、粘強度変化量などが得られるようにすることによって、低凝固活性の検体を測定可能ならしめるとともに、通常検体においては正確性の向上に寄与する血液凝固能測定のための血液凝固測定方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 血液凝固の機構を図3を参照して説明する。血液凝固の機構は通常二つの経路から起こるとされる。すなわち、一つの経路は、外因系凝固と言われる経路であり、表皮細胞等から放出される組織トロンボラスチンを出発点として凝固第VII因子が活性化され、この活性化された凝固第VII因子により凝固第X因子が活性化され、その後、凝固第V因子、第II因子の活性化が起こり、最終的にはフィブリノーゲンがフィブリンに転化

することにより凝固が起こる経路である。一般的に、この経路の凝固反応の強弱（即ち正常か異常かという判定）はプロトロンビン時間（PT）と言われる方法によって測定される。もう一つは、内因系凝固と言われる経路であり、接触等により、凝固第XII因子に活性化が起こり、第XI因子を活性化させる。引き続き活性化第XI因子は第IX因子を活性化させ、さらに活性化第IX因子はカルシウムイオン・第VIII因子の共同作用のもとに第X因子を活性化させる。その後、第V因子、II因子の活性化が起こり、最終的にはフィブリノーゲンがフィブリンに転化することにより凝固が起こる経路である。一般的に、この経路の凝固反応の強弱（即ち正常か異常かという判定）は活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、あるいは部分トロンボプラスチン時間（PTT）と言われる方法によって測定される。また、凝固反応の最終段階においてはフィブリノーゲンがフィブリンに転化する反応が必要であり、これにより凝固が完成する。このため、フィブリノーゲンの血中量を知ることもまた重要である。血中のフィブリノーゲン量を知る方法としてはクラウス（Claus）法と呼ばれる方法が一般的であるが、この方法は、既知のフィブリノーゲン含有物質と一定量のトロンビン試薬を混合した時に得られるフィブリノーゲン量と凝固時間の関係から、検体血漿のフィブリノーゲン量を算出する方法である。

【0003】 血液凝固の検出方法としては、血液が凝固するに従って液体の粘性が高くなるのを調べる方法（粘強度検出法）と、血液が凝固するに従って白く濁るのを検出する方法（濁度検出法）、およびこれら二つを混合した方法とに大別される。粘強度検出法は、検体となる血漿に棒状あるいは球状の磁性物等を投入し、凝固検出用試薬を混合したとき、凝固によってこれらの磁性物等の動きが鈍くなるのを検出する方法である。しかし、この粘強度検出法は血液凝固の最終産物であるフィブリン塊の形成状態（すなわち、フィブリン量が多少あるいは凝固状態の硬軟）によって測定結果が大きく左右されると言う特性を持ち、ある一定値以上の粘強度がなければ検出できないと言う致命的な欠点がある。また、磁性物等の動きを観察する測定原理であるために、磁性物等の強弱に影響されると言う欠点もある。濁度検出法は、検体血漿と凝固試薬とを混合することによってのみ凝固測定を行なう方法であり、磁性物等の投入は必要としない。検出する方法としては透過光検出方式、または散乱光検出方式がある。これらの検出方式ではフィブリノーゲン量が少ない場合でも透過光量の変化、あるいは散乱光量の変化として捉えることができるので、粘強度検出法にみられるような欠点はない。ただ、いずれの検出方法においても、光量の変化量が多いほうがより正確な検出ができることになるのは当然であるので、使用される凝固試薬は光変化量が大きく表示されるような特性を持つものが望ましい。

【0004】図2は、散乱光検出方式で得られる信号強度の変化を説明するための図である。血漿が凝固していく過程を光学式検出装置（散乱光検出方式）で調べた時の結果を示す。図中のA点は血漿と凝固試薬が混合された時点であり、その後、多段におよぶ凝固反応が進行し、安定的フィブリンの形成により散乱光の変化となって現れる（図中B点）。安定的フィブリンの形成が進行すると散乱光の変化は増加するが、ほとんどのフィブリノーゲンが消費され、散乱光量の変化はなくなり、反応は終息する（C点）。凝固時間は、たとえばB点の散乱光量を0%としC点の散乱光量を100%とする時の50%点である時間（T点）で表すことができる。ΔHは凝固反応開始時と終了時との散乱光量の変化分である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従来の凝固試薬は、凝固因子に対する活性化の反応性をより正確に持ち、かつ、最終的にフィブリンを形成することが命題であり、正確な測定結果の表示に関してはあまり省みられなかった。そのため、凝固に関する検査結果が大きくバラついていても容認するしかない状況となっていた。本発明が解決しようとする課題は、正確な測定結果の表示を行なうために、光学的変化量を大きくするような組成に調整することにある。このことによって、低凝固活性の検体を測定可能とならしめると共に、通常検体においては正確性の向上に寄与するものである。本発明は、上記の諸点に鑑みなされたもので、光学的変化量を大きくすることにより、低凝固活性の検体を測定可能にし、通常検体においては正確性を向上させることができる血液凝固測定方法を提供することを目的とするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するために、本発明の血液凝固測定方法は、検体血漿に試薬を混合して凝固反応を行なわせ、反応の進行に伴う混合液の光学的特性又は粘強度を経時的に追跡し、検体血漿の凝固能を測定する方法において、検体血漿に、高分子物質を混合する第一過程と、第一過程における混合液に、凝固因子活性化物質を含有する試薬を混合する第二過程と、を包含することを特徴としている。高分子物質としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリノキシリンなどからなる群より選ばれた高分子ビニルや、デキストラン、グリコーゲン、可溶性デンプン、デキストリン、アガロースなどからなる群より選ばれた高分子多糖などが使用できる。高分子物質は、高分子ビニル、高分子多糖の一方又は両方を使用する。例を挙げて詳細に説明すれば、例えばポリエチレングリコールでは分子量1,000~500,000（より好適には5,000~100,000、最良は20,000）のもの、デキストランでは分子量5,000~2,000,000（より好適には50,000~500,000、最良は170,000~200,000）のものが

良い。含有量については適宜決めれば良いが、少な過ぎると高感度の効果が得られず、多過ぎると未凝固時と凝固時の濁度差が不十分になるなどの不都合が発生するので、1~数%（W/V）が妥当である。上記の第一過程において、検体血漿中に高分子物質を直接混合してもよく、高分子物質を含有する液を検体血漿に混合してもよい。

【0007】凝固因子活性化物質を含有する試薬としては次のものがある。

(a) 組織トロンボプラスチン含有試薬

プロトロンビン時間試薬、ビタミンK由来酵素活性測定用試薬（複合因子測定用試薬）

(b) リン脂質含有試薬

部分トロンボプラスチン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間

(c) トロンビン含有試薬

フィブリノーゲン測定用試薬、AT-III測定用試薬

組織トロンボプラスチン含有試薬としては、プロトロンビン時間試薬（PT試薬、図3において外因系凝固反応を総合的に測定する試薬）が米国DADE社、ORTHO社、GD社、独国Berling社、BM社等から販売されている。ビタミンK由来酵素活性測定用試薬（複合因子測定用試薬）としてはエーザイ（株）よりトロンボテスト、ヘパラスチンテスト（いずれも商品名）として、また国際試薬（株）より複合因子H、複合因子T（いずれも商品名）として販売されている。リン脂質含有試薬としてはAPTT試薬またはPTT試薬（図3において内因系凝固反応を総合的に測定する試薬）が米国DADE社、ORTHO社、GD社、独国Berling社、BM社等から販売されている。トロンビン含有試薬としては、フィブリノーゲン測定用試薬、トロンビンタイム測定用試薬、あるいは、AT-III測定用試薬として、米国DADE社、ORTHO社、GD社、独国Berling社、BM社、国際試薬（株）等から販売されている。上記のように、本発明においては、凝固因子活性化物質を含有する試薬として、組織トロンボプラスチン含有試薬、リン脂質含有試薬、トロンビン含有試薬からなる群より選ばれた試薬を用いる。また、混合しようとする試薬を次の1~3の内、少なくとも1つの条件を満たす状態にしておくとともに感度が高くなる（3つの条件を満たした時が最良）。

1. 電気伝導度を4.0~15mSに調整する（より好適には6.5~11.0mS）。

2. pHを6.7~8.2に調整する（より好適には7.2~7.5）。

3. 浸透圧を100~700mOsm/kgcm³に調整する（より好適には350~700mOsm/kgcm³）。

電気伝導度の調整には電解質を用いれば良い（例えば食塩）。また、pHの調整には酸あるいはアルカリを用いれば良い（例えば塩酸、水酸化ナトリウム）。また、浸

透圧の調整には、非電解質であり同時に水溶性である物質を使用すれば良い（例えば糖類や尿素）。

【0008】

【作用】検体血漿に高分子物質含有液が混合される。この血漿に凝固因子活性化物質が混合されると、血漿中の凝固因子が次々に活性化されてゆき、最終的にフィブリノーゲン（繊維素原）がフィブリンに転化し凝固反応が終了する。その最終過程においては、まずフィブリンのモノマーができ、そのモノマーは次々に重合してポリマー（繊維状）を形成することによりフィブリンは繊維状になる。フィブリン繊維は網のように絡み合うことにより混合液は濁り、かつ、ゲル化する。凝固因子活性化物質混合から逐次混合液の光学的特性（例えば散乱光強度）を追跡することにより、凝固時間の測定をすることができる。本発明の方法では、凝固因子活性化物質の混合前に高分子物質を混合しているので、フィブリン繊維と高分子物質の共存により絡み合いはより複雑なものとなり、凝固因子活性化物質混合直後（凝固前）と凝固終了時の光学的特性の差は従来より大きくなる。つまり高感度になる。

【0009】

【実施例】以下、本発明の実施例を挙げて説明する。

実施例1

血漿に高分子物質として0.1% (W/V) デキストラン（分子量200,000）を添加したものと、なにも混合しない血漿とを使用して、プロトロンビン時間測定を行なった。結果、図1に示すような凝固曲線を得た。それらの凝固曲線を比較すると、高分子物質を混合した血漿では、これを混合しなかった血漿に比べ散乱光の変化量が大きくなり、凝固反応をより精密に解析できることがわかる。なお、凝固因子活性化物質を含有する試薬*

*として、DADE社トロンボプラスチンC（商品名）を検体0.1mlに対して、試薬0.2mlを添加・混合した。

【0010】実施例2

検体血漿中のフィブリノーゲン濃度を知るためには、一般的にクラウス（Claus）法と呼称される方法が採られる。この方法は、既知のフィブリノーゲン含有物質と一定量のトロンビン試薬を混合した時に得られるフィブリノーゲン量と凝固時間の関係から、検体血漿のフィブリノーゲン量を算出する方法であるが、手順としては、検体血漿20μlに対して180μlの緩衝液または生理食塩水を混合・希釈した後、凝固因子活性化物質としてトロンビン試薬（100μl）を添加し、凝固せしめる。本測定過程において、すなわち、緩衝液または生理食塩水を混合・希釈する過程において、本発明が主張するところの高分子物質を添加する。高分子物質としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリノキシリンなどの高分子ビニルや、デキストラン、グリコーゲン、可溶性デンプン、デキストリン、アガロースなどの高分子多糖などが使用できる。本実施例では、一例として、ポリエチレングリコール（分子量20,000）のもの、0.6% (W/V) を添加した。このとき、凝固反応による散乱光量の変化量を比較すると表1のようになる。高分子物質を添加しない従来法の散乱光の変化量に比較して、高分子物質を添加した本発明の方法の場合では、検出限界点の拡大と各フィブリノーゲン濃度における正確性の向上が認められる。なお、表1において、*印は測定不能を示している。

【0011】

【表1】

フィブリノーゲン濃度 [mg/dl]	従来法 (高分子物質 無添加)			本発明の方法 (高分子物質 添加)		
	凝固時間 [秒]	変動係数 (CV) [%]	散乱光変化量 (ΔH)	凝固時間 [秒]	変動係数 (CV) [%]	散乱光変化量 (ΔH)
500mg/dl	5.02	2.88	161.2	4.62	1.81	184.4
400mg/dl	5.82	3.63	135.2	5.52	1.53	145.2
230mg/dl	9.02	2.74	107.6	8.72	0.96	91.0
60mg/dl	30.14	6.01	20.8	27.443	3.08	27.4
50mg/dl	40.04	11.74	20.2	7.9650	4.07	23.6
40mg/dl	*	*	*	.48	4.82	20.4

【0012】

【発明の効果】本発明の方法により得られる高分子含有凝固反応組成物は、従来の凝固反応条件に比較して、血液凝固の最終産物であるフィブリン塊の形成状態が強く

であり、そのため、正確な凝固時間の検出ができるようになる。また、フィブリノーゲン量が少ない場合でも検出できる範囲が拡大すると言う特性を持つ。粘強度検出法を測定原理とする測定機器では、磁性物等の強弱に影

響されるという欠点も解決でき、また、濁度検出法においては透過光あるいは散乱光の変化量が増大し、より正確な検出ができることになる。以上は、血液凝固の分野において説明したが、凝固反応環境を整備し、反応を顕在化させる方法は、本発明が示す凝固因子活性化物質を使用した測定（プロトロンビン時間、ビタミンK由来酵素活性群測定（複合因子測定）、部分トロンボプラスチン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、フィブリノーゲン測定、A T-III測定）等に限定されず、最終的に凝固を発生せしめ、これを測定するもの全てに適用

10

できる。例としては、各凝固因子測定、ヘパリン測定、異常フィブリノーゲン検出（トロンビン時間測定）、その他凝固異常検出等が挙げられる。

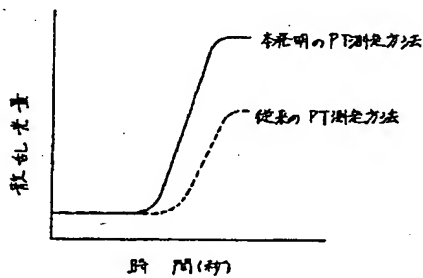
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法により血液凝固を測定した場合と、従来法により血液凝固を測定した場合の凝固曲線を示すグラフである。

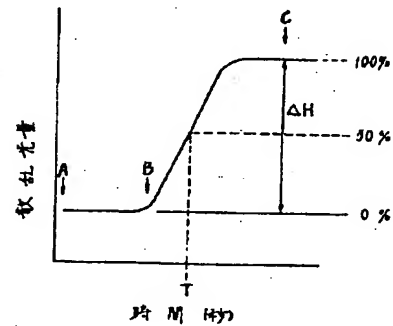
【図2】散乱光検出方式で得られる信号の変化と血液凝固との関係を示すグラフである。

【図3】血液凝固の機構を示すブロック図である。

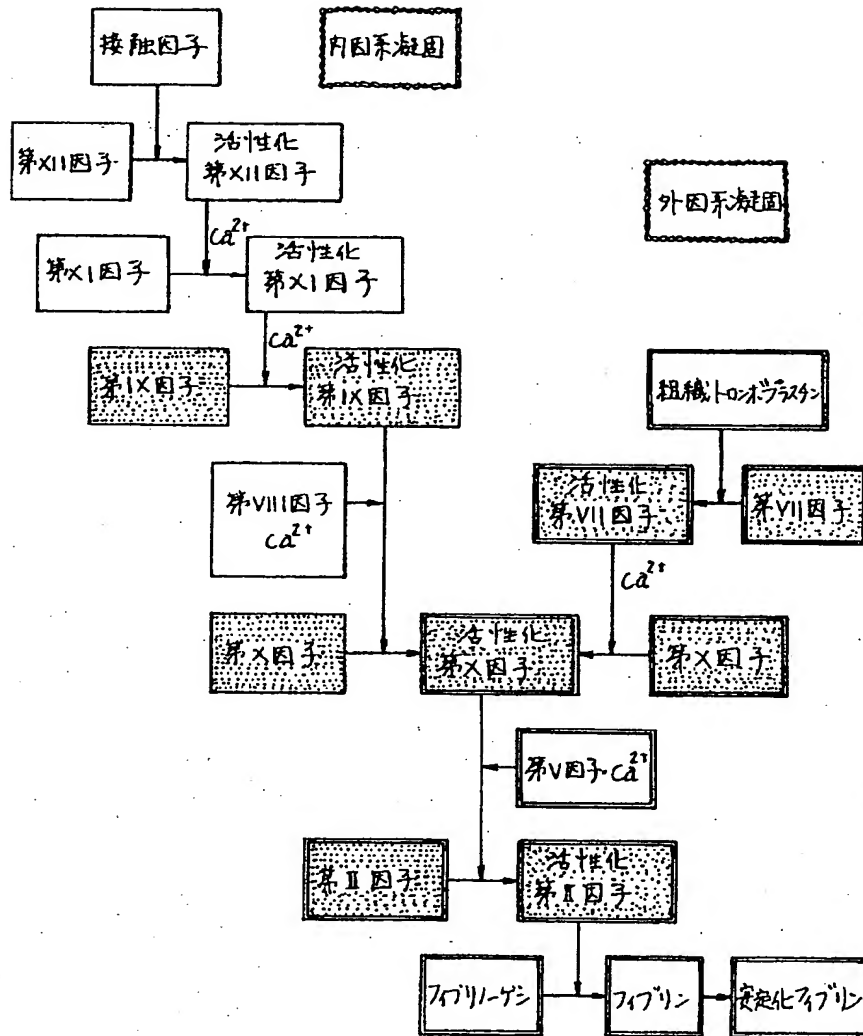
【図1】



【図2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成4年10月19日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】

【発明の効果】 本発明の方法により得られる高分子含

有凝固反応組成物は、従来の凝固反応条件に比較して、血液凝固の最終産物であるフィブリン塊の形成状態が強固であり、そのため、正確な凝固時間の検出ができるようになると共に、フィブリノーゲン量が少ない場合でも検出できる範囲が拡大すると言う特性を持つ。粘張度検出法を測定原理とする測定機器では、磁性物等の強弱に影響されると言う欠点も解決でき、また、濁度検出法においては透過光あるいは散乱光の変化量が増大し、より

正確な検出ができることになる。以上は、血液凝固の分野において説明したが、凝固反応環境を整備し、反応を顕在化させる方法は、本発明が示す凝固因子活性化物質を使用した測定（プロトロンビン時間、ビタミンK由来酵素活性群測定（複合因子測定）、部分トロンボプラスチン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、フィブリノーゲン測定、A T - I I I 測定）等に限定されず、最終的に凝固を発生せしめ、これを測定するもの全てに適用できる。例としては、各凝固因子測定、ヘパリン測定、異常フィブリノーゲン検出（トロンビン時間測定）、その他凝固異常検出等が挙げられる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の方法により血液凝固を測定した場合と、従来法により血液凝固を測定した場合の凝固曲線を示すグラフである。

【図2】 散乱光検出方式で得られる信号の変化と血液凝固との関係を示すグラフである。

【図3】 血液凝固の機構を示すブロック図である。

CLAIMS

Claim(s)]

Claim 1] In the method of mixing a reagent to sample plasma, making perform a solidification reaction, pursuing temporally the optical characteristic or the degree of **** of the mixed-solution accompanying advance of a reaction, and measuring the solidification ability of sample plasma The blood coagulation measuring method characterized by including the first process which mixes the Polymer Division substance to sample plasma, and the second process which mixes the reagent which contains a clotting factor activation substance into the mixed-solution in the first process.

A two step reagent =

Claim 2] The blood coagulation measuring method according to claim 1 characterized by using at least one side of Polymer Division vinyl and Polymer Division many sugar as a Polymer Division substance.

Claim 3] The blood coagulation measuring method according to claim 1 characterized by using the Polymer Division vinyl chosen from polyethylene glycols, polyvinyl alcohol, and the group that consists of poly NOKISHIRI as a Polymer Division substance.

Claim 4] The blood coagulation measuring method according to claim 1 characterized by using the Polymer Division many sugar chosen from the group which consists of dextran, glycogen, soluble starch, dextrin, and garose as a Polymer Division substance.

Claim 5] The blood coagulation measuring method according to claim 1 characterized by the first process being the process which mixes the Polymer Division substance directly in sample plasma.

Claim 6] The blood coagulation measuring method according to claim 1 characterized by the first process being the process which mixes the liquid containing the Polymer Division substance to sample plasma.

Claim 7] The blood coagulation measuring method according to claim 1 to 6 characterized by using the reagent chosen from the group which consists of a tissue thromboplastin content reagent, a phospholipid content reagent and a thrombin content reagent as a reagent containing a clotting factor activation substance.

ETAILED DESCRIPTION

Detailed Description of the Invention]

0001]

Industrial Application] a blood coagulation measuring method for this invention to measure the solidification activity of sample plasma using optical measurement equipment, the degree sensing device of ****, etc. — in detail If [the sample of low solidification activity], while closing by obtaining the bigger amount of optical change than before, the amount of degree change of ****, etc., it is related with the blood coagulation measuring method or the blood coagulation ability measurement which usually contributes to improvement in accuracy in a sample.

0002]

Description of the Prior Art] The mechanism of blood coagulation is explained with reference to drawing 3 . It is supposed that the mechanism of blood coagulation is usually happened from two courses. namely, — one course being a course called external cause system solidification, and making into a starting point tissue thromboplastin emitted from epidermic cells etc. — the [solidification] — [a VII factor is activated and] the [this / that was activated / solidification] — the Xth factor of solidification is activated by the VII factor — the [the Vth factor after that and solidification, and] — it is the course from which activation of II factor takes place, and solidification takes place when FIBURINOGEN finally converts into FIBURIN. Generally the strength (namely, judgment whether it is unusual whether it is normal) of the solidification reaction of this course is measured by the method called prothrombin time (PT). another is a course called internal cause system solidification — intact etc. — the [solidification] — activation takes place to a XII factor — the — XI factor is activated. accordingly — the [activation] — XI factor — the — activating IX factor — further — the [activation] — IX factor — the [calcium ion and] — the basis of working together of a VIII factor is made to activate the Xth factor Then, when activation of the Vth factor and II factor takes place and FIBURINOGEN finally converts into FIBURIN, it is the course which solidification starts. Generally the strength (namely, judgment whether it is usual whether it is normal) of the solidification reaction of this course is measured by the method called activated partial thromboplastin time (APTT) or partial thromboplastin time (PTT). Moreover, the reaction which FIBURINOGEN converts into FIBURIN in the final stage of a solidification reaction is required, and, thereby, solidification is completed. For this reason, it is also important to get to know the blood level of FIBURINOGEN. though the method called the Clowes (Clauss) method as a method of getting to know the amount of FIBURINOGEN in blood is common This method is the method of computing the amount of FIBURINOGEN and the amount of FIBURINOGEN of the relation of clotting time to sample plasma which are obtained when a fixed quantity of thrombin reagents are mixed with a known FIBURINOGEN content substance.

0003] It is divided roughly into the method (the degree of **** detecting method) of investigating the viscosity of a liquid becoming high as the detection method of blood coagulation as blood coagulates, the method (the turbidity detecting method) of detecting becoming muddy white as blood coagulates, and the method that mixed these two. The degree of **** detecting method is a method of detecting a motion of these magnetic matters etc. becoming blunt by solidification, when cylindrical or spherical magnetic matters etc. are fed into the plasma used as a sample and the reagent for solidification detection is mixed. However, there is a fatal fault said that the degree of **** detecting method is undetectable if a measurement result has the characteristic referred to as being influenced greatly according to the formation condition (that is, the amount of FIBURIN somewhat or hard and soft [of a solidification state]) of the FIBURIN lump which is the last product of blood coagulation and there is no degree of **** beyond a certain steady value. Moreover, since it is the measurement principle which observes a motion of magnetic matters etc., there is also a fault said are influenced by strength, such as magnetic matters. The turbidity detecting method is a method of performing solidification measurement only by mixing sample plasma and a solidification reagent, and the injection of magnetic matters etc. is not needed. As a method of detecting, there is a penetration photon detection method or a dispersion photon detection method. Since it can regard as change of penetration light volume, or change of dispersion light volume by these detection methods even when there are few amounts of FIBURINOGEN, there is no fault which is seen by the degree of *** detecting method. However, also in which detection method, since detection with a more exact way with many amounts of change of light volume can naturally be performed, the solidification reagent used has a desirable thing with the characteristic that the amount of optical change is displayed greatly.

0004] Drawing 2 is a figure for explaining change of the signal strength obtained by a dispersion photon detection method. A result when an optical sensing device (dispersion photon detection method) investigates the process which plasma solidifies is shown. A point in a figure is a time of a solidification reagent being mixed with plasma, after that, the solidification reaction which reaches many stages advances, and serves as change of dispersion light by formation of stable FIBURIN, and appears (B point in a figure). If formation of stable FIBURIN advances, range of dispersion light will increase, but almost all FIBURINOGEN is consumed, change of dispersion light volume is lost, and a reaction ceases (C point). Clotting time can be expressed with time (T point) to be a 50% point when making dispersion light volume of B point into 0%, for example, and making dispersion light volume of C point into 100%. **H is a changed part of dispersion light volume with the time of a solidification reaction start and an end.

0005]

problem to be solved by the invention] It is a proposition to have the reactivity of the activation to a clotting factor more correctly, and to form FIBURIN finally, and it seldom had regard [reagent / conventional / solidification] about the display of an exact measurement result. therefore, the inspection result about solidification — large — Bala — ***** is just also admitted — it had become the situation which is not spread. There is a technical problem which this invention tends to solve in preparing to composition which enlarges the amount of optical change, in order to display an exact measurement result. By this, while making the sample of solidification activity become measurable, in a sample, it usually contributes to improvement in accuracy. By having been made in view of above-mentioned many points, and enlarging the amount of optical change, this invention makes the sample of low solidification activity measurable, and aims at offering the blood coagulation measuring method which can usually raise accuracy in a sample.

0006]

means for solving problem] In order to attain the above-mentioned purpose, [the blood coagulation measuring method of this invention] In the method of mixing a reagent to sample plasma, making perform a solidification reaction, pursuing temporally the optical characteristic or the degree of **** of the mixed-solution accompanying advance of a reaction, and measuring the solidification ability of sample plasma It is characterized by including the first process which mixes the Polymer Division substance to sample plasma, and the second process which mixes a reagent which contains a clotting factor activation substance into the mixed-solution in the first process. The Polymer Division many sugar chosen from the group which consists of Polymer Division vinyl chosen from the group which consists of polyethylene glycols, polyvinyl alcohol, poly NOKISHIRIN, etc. as a Polymer Division substance, dextran, glycogen, soluble starch, dextrin, agarose, etc. can be used. Both Polymer Division vinyl, and Polymer Division many both [one side or] are used for the Polymer Division substance. If an example is given and it explains in detail, for example by polyethylene glycols The thing of a molecular weight 1,000-500,000 (100-100,000 and best are 20,000 suitably), In dextran, the thing of a molecular weight 5,000-2,000,000 (50,000-2,000 and best are 170,000-200,000 suitably) is good. Although what is necessary is just to decide suitably but content, since un-arranging — the turbidity difference at the time of un-solidifying and solidification comes inadequate — will occur if too large [if too small, the effect of high sensitivity will not be acquired, :], one to several % (W/V) is appropriate. In the first above-mentioned process, the Polymer Division

substance may be directly mixed in sample plasma, and the liquid containing the Polymer Division substance may be mixed to sample plasma.

[0007] As a reagent containing a clotting factor activation substance, some are following.

(a) A tissue thromboplastin content reagent prothrombin time reagent, the reagent for vitamin K origin enzyme activity measurement (reagent for compound factor measurement)
 (b) Phospholipid content reagent partial thromboplastin time, activated partial thromboplastin time (c) The reagent for thrombin content reagent FIBURINOGEN measurement, As a reagent tissue thromboplastin content reagent for AT-III measurement, the prothrombin time reagent (PT reagent, reagent which measures an external cause system solidification reaction synthetically in drawing 3) is sold by U.S. DADE, ORTHO, GD, German country Bering, BM, etc. As a reagent for vitamin K origin enzyme activity measurement (reagent for compound factor measurement), it is sold from Eisai Co., Ltd., and is sold as the compound factor H and a compound factor T (all are brand names) from International Reagents Corp. as a thrombo test and a HEPAPURASUCHIN test (all are brand names). As a phospholipid content reagent, the APTT reagent or the PTT reagent (reagent which measure internal cause system solidification reaction synthetically in drawing 3) is sold by U.S. DADE, ORTHO, GD, German country Bering, BM, etc. As a thrombin content reagent, it is sold from U.S. DADE, ORTHO, GD, German country Bering, BM, and International Reagents Corp. as the reagent for FIBURINOGEN measurement, the reagent for thrombin time measurement, or a reagent for AT-III measurement. As mentioned above, in this invention, the reagent chosen from the group which consists of a tissue thromboplastin content reagent, a phospholipid content reagent, and a thrombin content reagent as a reagent containing a clotting factor activation substance is used. Moreover, if the reagent which it is going to mix is changed into the state of fulfilling at least one condition among the following 1-3, sensitivity will become high further (the time of fulfilling the conditions whose number is three is best).

. Adjust electrical conductivity to 4.0-15mS (suitably 6.5-11.0 mS).

. Adjust pH to 6.7-8.2 (suitably 7.2-7.5).

. Adjust osmotic pressure to 100 - 700 mOsm/kgcm² (suitably 350 - 700 mOsm/kgcm²).

What is necessary is just to use an electrolyte for adjustment of electrical conductivity (for example, salt). Moreover, what is necessary is just to use acid or alkali for adjustment of pH (for example, chloride, sodium hydroxide). Moreover, what is necessary is just to use the substance which is a non-electrolyte and is water solubility simultaneously for adjustment of osmotic pressure (for example, sugars and urea).

[0008]

[Function] Polymer Division substance content liquid is mixed by sample plasma. If a clotting factor activation substance is mixed by this plasma, the clotting factor in plasma will be activated one after another, finally FIBURINOGEN (fibrin Hara) will convert into FIBURIN, and a solidification reaction will be completed. In the last process, the monomer of FIBURIN is made first and FIBURIN becomes a fiber type by the monomer's polymerizing one after another and forming polymer (fibrous). When a FIBURIN fiber becomes entangled like a net in the mixed-solution becomes muddy and is gelled. Clotting time can be measured by pursuing the optical characteristic (for example, dispersion light intensity) of the mixed-solution one by one from clotting factor activation substance mixture. By the method of this invention, since the Polymer Division substance is mixed before mixture of a clotting factor activation substance, a tangle will become more complicated by coexistence of FIBURIN fiber and the Polymer Division substance, and the difference of the optical characteristic immediately after clotting factor activation substance mixture (before solidification) and at the time of the end of solidification will become larger than before. That is, it becomes high sensitivity.

[0009]

[Working example] The example of this invention is given and explained hereafter.

What added dextran (molecular weight 200,000) 0.1% (W/V) as a Polymer Division substance, and the plasma which nothing mixes were used for example 1 plasma, and as a result of performing prothrombin time measurement, the solidification curve as shown in drawing 1 was obtained. When those solidification curves are compared, in the plasma which mixed the Polymer Division substance, it turns out that the amount of change of dispersion light becomes large compared with the plasma which did not mix this, and a solidification reaction can be analyzed more precisely. In addition, as a reagent containing a clotting factor activation substance, to 0.1ml of samples, DADE TRON BOPURASUCHIN C (brand name) was added, and 0.2ml of reagents were mixed.

[0010] In order to know the FIBURINOGEN concentration in example 2 sample plasma, the method generally called the Clowes (Claus) method is taken. [a method] although this method is the method of computing the amount of FIBURINOGEN and the amount of FIBURINOGEN of the relation of clotting time to sample plasma which are obtained when a fixed quantity of thrombin reagents are mixed with a known FIBURINOGEN content substance After 20micro of sample plasma's mixing and diluting the buffer solution or the physiological saline of 10microl to 1 as a procedure, a thrombin reagent (100microl) is made to add and solidify as a clotting factor

activation substance. In this measurement process, the Polymer Division substance which this invention asserts is added in the process which mixes and dilutes buffer solution or a physiological saline. As a Polymer Division substance, Polymer Division many sugar, such as Polymer Division vinyl, such as polyethylene glycols, polyvinyl alcohol, and poly NOKISHIRIN, and dextran, glycogen, soluble starch, dextrin, agarose, etc. can be used. In this example, the thing of polyethylene glycols (molecular weight 20,000) and 0.6% (W/V) were added as an example. At this time, if the amount of change of the dispersion light volume by a solidification reaction is measured, it will become as it is shown in Table 1. In the case of the method of this invention which added the Polymer Division substance, as compared with the amount of change of the dispersion light of the conventional method which does not add the Polymer Division substance, expansion of a detection limit point and improvement in the accuracy in each FIBURINOGEN concentration are accepted. In addition, in Table 1, * mark shows incapable measurement.

Table 1]

フィブリノ ーゲン濃度 [mg/dl]	従来法 (高分子物質 無添加)			本発明の方法 (高分子物質 添加)		
	凝固 時間 [秒]	変動係数 (CV) [%]	散乱光変 化量 (ΔH)	凝固 時間 [秒]	変動係数 (CV) [%]	散乱光変 化量 (ΔH)
500mg/dl	5.02	2.88	161.2	4.62	1.81	184.4
400mg/dl	5.82	3.63	135.2	5.52	1.53	145.2
230mg/dl	9.02	2.74	107.6	8.72	0.96	91.0
60mg/dl	30.14	6.01	20.8	27.443	3.08	27.4
50mg/dl	40.04	11.74	20.2	7.9650	4.07	23.6
40mg/dl	*	*	*	.48	4.82	20.4

→ assay volume = 0.5% w/v

012]

Effect of the Invention] [the Polymer Division content solidification reaction constituent obtained by the method of this invention] While coming to be able to perform detection of clotting time with a formation condition of the FIBURIN lump which is the last product of blood coagulation exact firmly therefore as compared with the conventional solidification reaction conditions, it has the characteristic referred to as that the range which can be detected even when there are few amounts of FIBURINOGEN is expanded. In the measuring equipment which makes the degree of **** detecting method a measurement principle, the fault said are influenced by strength, such as magnetic matters, can also be solved, and the amount of change of penetration light or dispersion light will increase in the turbidity detecting method, and more exact detection can be performed. Although the above is explained in the field of blood coagulation [the method of improving solidification reaction environment and equalizing a reaction] the measurement (prothrombin time —) which uses the clotting factor activation substance which this invention shows It is not limited to vitamin K origin enzyme activity group measurement compound factor measurement), partial thromboplastin time, activated partial thromboplastin time, FIBURINOGEN measurement, AT-III measurement, etc., but solidification is made to generate finally, and it can apply to all the things that measure this. As an example, each clotting factor measurement, heparin measurement, usual FIBURINOGEN detection (thrombin time measurement), other clotting abnormality detection, etc. are mentioned.

translation completed.]